

면역크로마토그래피법을 이용한 B형간염 진단용 kit의 개발

†신형순·¹신광순·²정홍근·허태련
인하대학교 생물공학과, ¹충남대학교 수의학과, ²서울대학교 의과대학 생화학교실
(접수 : 2000. 3. 17., 게재승인 : 2000. 4. 25.)

Development of Diagnostic kit for Hepatitis B Surface Antigen using Immuno-chromatographic Assay Method

Hyeong-Soon Shint, Kwang-Soon Shin¹, Hong-Keun Chung², and Tae-Ryeon Heo
Dept. of Biological Engineering, Inha University, Inchon 402-751

¹Dept. of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764

²Dept. of Biochemistry, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-744, Korea

(Received : 2000. 3. 17., Accepted : 2000. 4. 25.)

A hepatitis B Surface Antigen(HBsAg)-screening kit using immuno-chromatographic assay(ICA) method was developed by employing two kinds of antibodies. One is mouse monoclonal anti-HBs for tracer antibody and the other is goat polyclonal anti-HBs for capture antibody. This capture antibody was immobilized on the surface of nitrocellulose(NC) membrane and the tracer antibody was conjugated with gold particles. When serum sample was added to the sample well, the conjugates deposited in a dry state on the surface of glass fiber filter were reconstituted and then combined with HBsAg in serum. In 5 min after adding, the assay result was visible through the window, that is, the complexes composed of HBsAg and the conjugates appeared as maroon line on the lower part of the NC membrane. The detection limit of the ICA kit was 2 ng/ml when being tested with the reference HBsAg.

Key Words : HBsAg, immuno-chromatographic assay, gold particle, monoclonal anti-HBs

서 론

B형간염은 B형간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV)가 그 원인균인데(1) 감염 여부는 혈청 중에 HBV의 표면항원(hepatitis B surface antigen, HBsAg)의 유무로 판정한다(2). HBsAg는 다시 4종류의 subtype, 즉 adr, ayr, adw, ayw 등으로 나뉘는데(3) B형간염의 진단은 주로 공통항원인 'a'에 대한 검사로 이루어진다(4). 현재 Hepatitis B virus(HBV)에 의하여 발생하는 B형 간염의 스크리닝에 널리 사용되고 있는 진단법으로는 역수동혈구응집법(5)과 방사면역측정법(4), 효소면역측정법(6) 등이 있다. 혈구응집법(heme agglutination)은 주로 양의 적혈구를 이용하는데, 검체 혈청중의 B형 간염 표면항원(HBsAg)과 응집되는 것을 관찰하는 방법이다. 효소면역측정법(enzyme immunoassay)은 HBsAg가 가지고 있는 여러 가지

항원결정기(epitope) 중 한 항원결정기에 대한 anti-HBs 항체를 matrix에 고정시키고 HBsAg를 반응시킨 후 다시 다른 항원결정기를 인식하는 항체에 horse radish peroxidase (HRP)를 결합시킨 conjugate를 반응시키고 발색제를 가해 HBsAg를 확인하는 것이다. 방사면역측정법(radioimmunoassay)은 위의 방법 중에서 HRP 대신에 방사성 동위원소를 결합시켜 사용하는 것이다. 혈구응집법은 결과의 판독에 특별한 기계를 이용하지 않고 간편하게 육안으로 결과를 알 수 있다는 장점이 있으나 sandwich법이 아니기 때문에 감도가 덜 예민하다는 단점이 있다(7). 방사면역측정법과 효소면역측정법은 가장 정확하고 예민하지만 기계를 이용해야 하기 때문에 복잡하고 비용이 많이 들며 검사시간이 오래 걸리는 등의 단점이 있다. 이런 기존의 검사방법들은 이러한 단점에도 불구하고 이들을 대체할 만한 적당한 방법이 없었기에 그대로 사용되어 왔다.

금 입자(gold particle)를 면역학적 방법에 사용한 것은 원래 전자현미경의 관찰을 돕기 위한 방법으로 사용되었다(8, 9). 1988년 May등(10)은 라텍스 입자를 이용한 면역크로마토그래피법(immuno-chromatographic assay)을 최초로 개발하여 면역측정법에 일대 혁명을 가져왔다. 이는 시료를 단순히 4-5방울 떨어뜨리는 한 단계의 작업으로 모든 조작이 완료되는

†Corresponding Author : Dept. of Biological Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7511, Fax : 032-873-4429
E-mail : shinkimm@dreamwiz.com

획기적인 방법이였다. 그후 금 입자를 면역크로마토그래피법에 응용하면서 발전을 거듭하여 최근에는 *Helicobacter pylori* 진단(11), 결핵진단(12), 가축에서 rotavirus 진단(13), 우유속의 progesteron 측정(14), Dengue virus 진단(15) 등에 응용되는 등 매우 중요한 연구 주제가 되고 있다. ICA의 원리는 검체 속에 들어있는 항원이 유색입자에 결합된 표식자항체와 결합하여 nitrocellulose(NC)막의 미세구멍을 통하여 이동하는 중 막에 고정되어 있는 포획항체와 결합하여 발색띠를 형성함으로써 양성·음성을 육안으로 판별하는 것이다. 이 방법은 희석이나 세척 등의 조작이 필요 없이 단순하게 시료를 몇 방울만 떨어뜨리면 판독이 가능하므로 전문가가 아닌 사람도 쉽게 사용할 수 있고 도구나 기계 없이 사용할 수 있으며 실험결과도 counter나 reader 같은 기계를 사용해야 하는 기존의 방법들과는 달리 육안으로 판정할 수 있다. 반응시간도 다른 방법들 보다 대단히 빨리 시험을 시작하지 5분이면 판독이 가능하다. 이러한 장점으로 인하여 이 ICA 방법은 임상실험실뿐만 아니라(16) 응급실이나 사고현장에서, 헌혈시, 수혈 직전 등에서 이용하기에 특히 편리하다.

본 연구에서는 이미 확보되어 있는 HBsAg에 대한 단세포군 anti-HBs 항체를 활용하여 금 입자를 이용하는 면역크로마토그래피 kit를 개발하였다.

재료 및 방법

단세포군항체의 생산 및 정제

H30-1-6 hybridoma cell을 Balb/c 마우스 한 마리 당 10^7 씩 복강에 주사하여 약 2주일 후 복수를 채취하였다. 여기에 동량의 50% 포화 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma, 미국) 용액을 가하여 4°C에서 1 시간 정치시킨 후 10,000Xg로 30 분간 원심분리하여 침전물을 phosphate-buffered saline(PBS)으로 투석하였다. 투석인 끝난 후 동량의 결합완충액(binding buffer, Pierce, 미국)과 섞어 protein A-Sepharose column에 가하고 5 배량의 결합완충액으로 세척한 후 elution 완충액(Pierce, 미국)을 가하여 분리되어 나오는 정제된 항체를 수집하였다.

단세포군항체의 등전점 결정

단세포군항체의 등전점 결정은 미국의 Novex사에서 구입한 kit로 수행하였다. 단세포군항체(H31-1-6) 2 μg 을 1X 음극완충액(pH 3-10) 10 ml에 희석한 후 동량의 IEF (isoelectric focusing) sample buffer (pH 3-10)를 첨가하였다. IEF gel(pH 3-10)에 준비된 단세포군항체 시료 20 μl 를 loading한 후 1X 음극완충액(pH 3-10)와 1X 양극완충액(pH 3-10)을 채우고 100 V에서 1 시간 동안 전개시켰다. 다시 200 V에서 1 시간, 500 V에서 30 분간 연속하여 전개시킨 후 IEF gel을 고정액(100 mM sulphosalicylic acid, 700 mM TCA)에서 30분간 고정시켰다. 고정된 gel을 Coomassie blue 염색액(0.1% Coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 10분간 염색한 후 탈색액(10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 탈색하여 Imagemaster VDS(Fuji film사, 일본)로 촬영하였다.

금 입자의 제조

금 입자는 HAuCl_4 를 구연산으로 환원시키는 방법을 사용

하여 제조하였다(17). 즉 200 ml의 증류수를 끓인 후 1% 구연산나트륨을 각각 7, 3, 1 및 0.5 ml씩 첨가하여 교반하면서 4% HAuCl_4 용액을 0.5 ml 씩 가하여 30분간 교반하고 나서 상온에서 냉각하였다. 또한 각각의 반응용액을 spectrophotometer(Shimadzu Model UV-265, 일본)를 사용하여 500~600 nm 파장에서 scanning하였고 전자현미경 사진으로 입자의 크기를 확인하였다.

금 입자와 항체의 conjugate 제조

준비된 금 입자중 입자 크기가 40 nm 내외의 것을 사용하였다. 이 금 입자 현탁액을 소량 분획하여 0.25M K_2CO_3 용액으로 pH를 맞추고 30 분 이내에 항체 흡착에 이용하였다. 응집곡선은 항체를 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하고 10 분간 교반한 다음 10% NaCl 용액을 최종농도 1% 되게 첨가하여 응집이 되지 않는 농도를 결정한 후 사용할 금 입자 현탁액에 항체를 넣고 10 분간 교반한 뒤, 10% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA) 용액을 사용하여 최종농도가 3% 되게 첨가한 후 2 분간 교반한다. 이후 1% polyethylene glycol(PEG) 20,000를 최종농도 0.3% 되게 첨가한 후 10 분간 교반한다. 11,000Xg에서 1 시간 원심분리하고, 세척액(5% BSA, 0.1% PEG, 50mM Tris, pH 8.0)으로 2회 세척한 후 conjugate buffer(5% BSA, 0.1% PEG, 50mM Tris, pH 8.0)에 현탁하여 사용하였다.

Assay strip의 제조

Pore size 0.8 μm 의 NC막(Schleicher & Schuell사, 독일)에 Bioject dispenser(BIODOT사, 미국)를 사용하여 1 mg/ml의 goat anti-HBs(Jackson Lab사, 미국) 용액을 분사하여 양성선(test line)을 긋고 37°C 항온기에서 하룻밤 동안 정치시켜 항체를 막에 고정시켰다. 대조선(control line)에는 goat anti-mouse IgG(Jackson Lab사, 미국)를 사용하였다. Conjugate를 완충액에 현탁한 후 glass fiber filter(Whatman, 독일)에 흡착시키고 37°C oven에서 3시간 건조하여 사용하였다. Backing plate(3M, 미국)에 고정된 NC막, conjugate pad 및 아래와 위쪽에 흡습여지(Whatman, 독일)를 lamination module(BIODOT사, 미국)을 사용하여 붙이고 절단기를 사용하여 0.6 mm의 폭으로 절단하여 assay strip을 제조하였다.

반응소요시간의 결정

고려대학교 부속병원 임상병리과에서 Behringer Mannheim 사(독일)의 Enzygnost HBsAg로 음성 혹은 양성으로 판정된 혈청을 수집하여 위와 같은 방법으로 제조된 assay strip을 미리 strip에 맞게 준비된 cassette housing(6x58 mm)에 넣어 kit 조립을 완성하고 kit의 sample well에 혈청 160 μl 를 가하여 대조선 혹은 양성선이 확실하게 나타나는 시간을 측정하였다.

검출한계의 결정

독일의 Paul-Urlhich Institute로부터 구입한 HBsAg 표준용액을 0.01% BSA가 포함된 PBS로 2배 연속 희석하여 각각의 농도별로 160 μl 씩 assay strip에 가하여 양성으로 판정되는 최대희석배수의 HBsAg 농도를 검출한계(detection limit)로 결정하였다.

결과 및 고찰

단세포균항체의 등전점 결정

HBsAg에 대한 단세포균항체인 H31-1-6의 pI값은 7.3 이었고 gel 상에 나타난 band는 3개에서 6개까지 관찰되었다 (Figure 1). 이러한 현상은 항체가 체내에서 만들어질 때 단백질 합성후 glycosylation 과정 중 그 정도의 차이에 의하여 생기는 현상으로 생각된다. 이것은 Mimura등(18)이 보고한 내용과 같은 결과인데 이들은 항체가 합성된 후 세포외에서 수식 (modification) 될 뿐만 아니라 세포내에서도 수식이 일어나 다양한 band들이 생긴다고 보고하였다.

금 입자의 제조

구연산 환원법으로 제조한 입자의 크기는 첨가된 구연산의 양에 역비례하였다. Table 1에 표시한 바와 같이 0.5 ml부터 7 ml까지 구연산 용액의 양을 증가시켜 제조된 금 입자의 크기를 전자현미경으로 확인하였을 때 20~150nm의 다양한 크기의 금입자가 생성되었으며(Figure 2), 500nm에서 600nm까지 흡광도를 scanning 했을 때 최대흡광도는 555~515nm의 분포를 보였다(Figure 3). 이러한 결과는 Frens(17)가 보고한 결과와는 다소 차이를 보이는 결과인데 구연산 환원법으로 금입자 제조시의 온도 및 교반 정도 등의 차이에서 연유된 환원력의 차이에 의한 것으로 판단다. 일반적으로 환원력이 크면 작은 입자가, 환원력이 적으면 큰 입자가 생성된다. Horisberger와 Rosset(19)은 환원력이 큰 ascorbic acid를 사용하여 5 nm 크기의 작은 입자를 만들어 면역조직화학에 응용하기도 하였다.

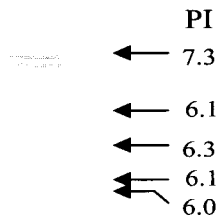


Figure 1. Isoelectric focusing of monoclonal antibody H31-1-6. Prepared sample was loaded and separated on pH 3-10 IEF gel. The lane was loaded with 2 μ g of H31-1-6. pI of each band was indicated by arrow head.

Table 1. The effect of sodium citrate concentration on the size of gold particles (reaction volume : 200 ml).

Amount of 1% sodium citrate sol'n	Diameter (nm)	Wave length for Maxium Absorbance (nm)	Color
7 ml	20	515	Red
3 ml	40	525	Red
1 ml	80	540	Dark Red
0.5 ml	150	555	Violet

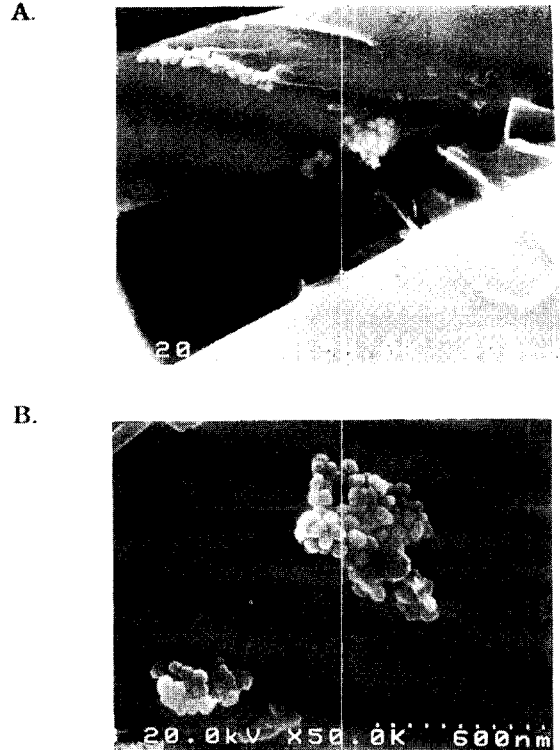


Figure 2. Scanning electron micrograph of gold particles. A : 40 nm(X 50,000) B : 80 nm(X 50,000)

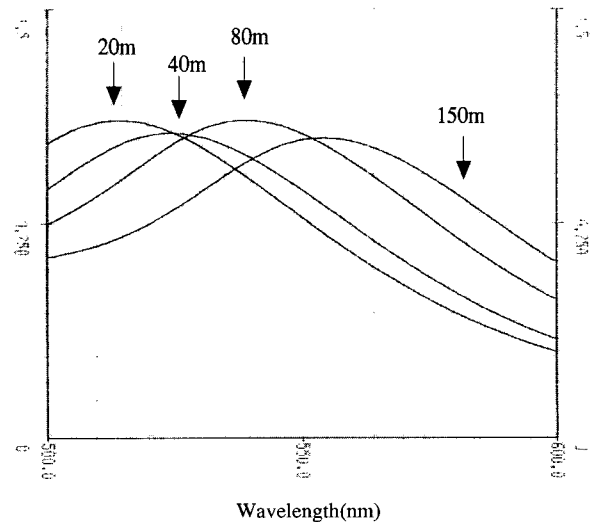


Figure 3. Spectrophotometric absorption spectrum of gold particles with different sizes.

금 입자와 항체의 conjugate 제조

금 입자에 단세포균항체를 결합시켜 conjugate를 제조할 때 pH 및 항체의 농도가 매우 중요하다(20). 따라서 pH 4~8의 범위에서 항체를 5 μ g/ml의 농도로 첨가하여 최적 pH를 찾아본 결과 Figure 4에 나타난 바와 같이 pH 8에서 가장 높은 흡광도를 나타냈고 최종농도 1% NaCl에서도 응집되지 않아 가장 안정된 conjugate의 sol을 형성하였으며 pH 5의 경우는

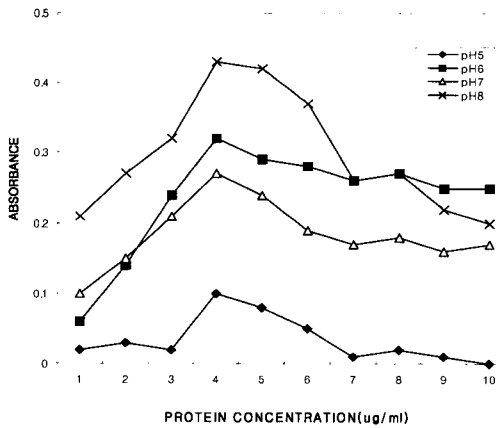


Figure 4. The effect of pH and antibody concentration on flocculation curve for H31-1-6. Different amount of IgG was respectively added to 1 ml of suspensions of gold particles. After binding equilibrium (about 20 min.), flocculation of particles was induced by adding 1% NaCl(final concentration) and absorbance was measured at 580nm.

대부분이 응집이 일어나 sol 형성에 실패하였다. 이러한 결과는 H31-1-6 항체의 pI가 7.3인 점을 고려해 볼 때 conjugate 형성을 위한 최적 pH는 결합되는 항체의 pI와 관계가 있는 것으로 짐작된다. Geoghegan(20)의 결과에 의하면 pI보다 pH를 높여 반응했을 때 금 입자와 IgG의 결합율이 감소하며 높은 pI 값을 갖는 IgG의 경우 pH 8 이상의 알칼리 pH에서 결합율을 높이는 결과를 얻었다. 또한 Norde(21)는 항체가 금 입자에 결합할 때 단백질의 pI를 고려하여 pI 근처의 pH에서 가장 좋은 결과를 얻고 있다. 본 실험결과는 Norde(21)의 보고와 일치하는 결과로 항체의 성격에 따라 보통 pI보다 0.5정도 높은 pH에서 반응시키는 것이 좋은 것으로 판단된다.

또한 pH 8에서 항체농도를 1 µg/ml~10 µg/ml까지 높이면서 실험하였을 때 4 µg/ml의 항체농도에서 NaCl을 최종농도 1% 되게 가하였을 때에도 응집되지 않고 높은 흡광도를 유지하여 가장 안정된 conjugate가 제조되었다. IgG의 양이 많을 수록 결합율은 떨어지지만 총량으로는 더 많이 결합하는 것으로 보고되었으나(20) 본 실험에서는 8 µg/ml 이상에서는 최적 pH라고 하더라도 conjugate가 잘 형성되지 않았다. 따라서 항체농도는 4~5 µg/ml의 농도가 가장 적절한 것으로 판단되며 conjugate의 활성측면을 고려하여 최적조건인 4 µg/ml 보다 다소 많은 4.5 µg~5 µg/ml의 항체농도를 사용하는 것이 바람직할 것이다.

반응소요시간의 결정

전술한 방법으로 제조된 assay strip을 cassette housing에 넣어 kit를 조립하고 혈청 검체 160 µl를 kit의 sample well에 일정 시간 간격으로 가하여 전개도, 양성선 및 대조선의 발색양상을 관찰하였다(Figure 5). 전개 1분 경과 후부터 양성선이 나타나기 시작하여 시간이 경과함에 따라 색이 짙어졌으며 3분이 경과하자 대조선이 나타났으나 붉은 색 입자가 이동하는 것으로 보아 반응이 완결되지 않았음을 알 수 있었고 이 현상은 약 5분 경과 후까지 계속 되었지만 그 후에도 색깔이 계속 짙어져 반응이 계속되고 있음을 볼 수 있었다. 그러나 전체적으로 양성 반응은 1분내에 시작되어 5분 정도면 확인 할 수 있었다.

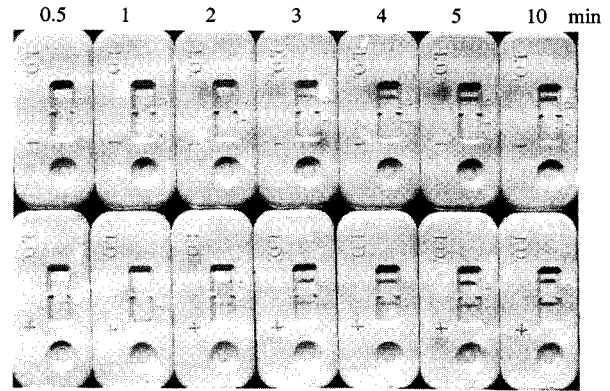


Figure 5. The development of sample and coloring reaction of HBs Ag-ICA kit according to the time passed by after loading. The negative serum was loaded into the upper cassettes and the positive into the lower.

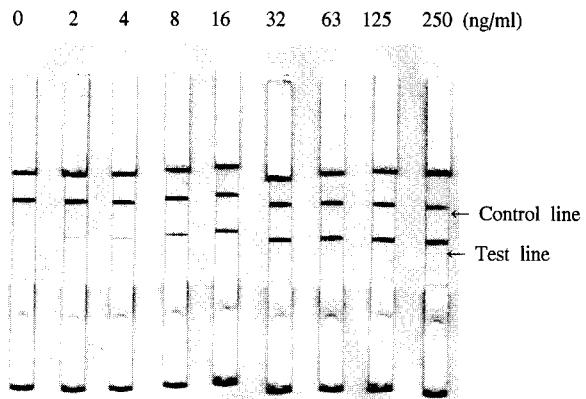


Figure 6. Results of immunochromatographic assay for the detection of HBsAg. Control line was coated with goat anti mouse IgG and Test line was coated with monoclonal anti-HBs antibody.

검출한계의 결정

독일의 Paul-Urlich Institute로부터 구입한 HBsAg 표준용액을 0.01% BSA가 포함된 PBS로 2배 연속 희석하여 각각의 농도별로 160 µl씩 시험관에 가하고 여기에 assay strip을 수직으로 세워 넣고 5 ~ 10 분 후 양성선을 확인하였을 때 약 2 ng/ml의 HBsAg 농도까지 양성으로 판정되었으므로(Figure 6) 본 assay strip의 HBsAg에 대한 검출한계는 2 ng/ml로 결정되었다.

요 약

면역크로마토그래피 진단방법을 이용하는 B형간염 스크리닝 kit를 개발하기 위하여 두가지의 항체를 이용하였다. 표식자항체로 사용된 것은 단세포균항체 anti-HBs이고 포획항체는 goat anti-HBs인데 포획항체는 니트로셀룰로즈 막에 고정되고 표식자항체는 금 입자에 결합된다. 혈청 검체를 well에 가하면 유리섬유 표면에 건조상태로 침착되어 있던 conjugate가 활성화되어 검체중의 HBsAg와 결합한다. 검체를 가한 지 5분 후 검사결과가 나타나는데 HBsAg와 conjugate가 결합된 복합체가 니트로셀룰로즈 막의 하단부에 붉은 색 선으로 나타난다. 본 kit의 검출한계는 표준 HBsAg 용액을 사용하여 시험하였을 때 2 ng/ml이었다.

REFERENCES

1. Nordenfelt, E. (1975), Some epidemiological and clinical aspects of hepatitis B antigen and its subtypes, *Scand. J. Infect. Dis.*, **7**(2), 147-152.
2. Luengrojanakul, P., H. Ohnuma, K. Tachibana, S. Usuda, H. Okamoto, T. Tanaka, F. Tsuda, A. Machida and M. Mayumi (1990), Common and subtypic determinants of hepatitis B surface antigen particles: susceptibility to reduction and/or alkylation evaluated with monoclonal antibodies, *Jpn. J. Exp. Med.*, **60**(5), 253-261.
3. Swenson, P.D., J.T. Riess and L.E. Krueger (1991), Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies, *J. Virol. Methods*, **33**(1-2), 27-38.
4. Petrilli, F.L., P. Crovari, and S. De Flora (1975), Quantitative detection and typing of HBsAg and anti-HBs by radioimmunoassay techniques. *Dev. Biol. Stand.*, **30**, 103-110.
5. Withers, M.J., G.V. McCahill, P.D. Griffiths, R.B. Heath, Jr Pattison and D.S. Dane, (1976), A comparative study of passive haemagglutination methods for the detection of hepatitis B surface antigen in routine hospital practice. *J. Clin. Pathol.*, **29**, 732-735.
6. Haas, J. (1980), Rapid detection of HBsAg and anti-HBs by enzyme-immunoassay. *J. Virol. Methods*, **2**, 63-69.
7. Hendry, R.M., L.W. Herzog and J.E. Herrman (1983), Comparison of enzyme immunoassay with radioimmunoassay for the detection of hepatitis B surface antigen. *J. Med. Microbiol.*, **16**, 11-116
8. Geoghegan, W.D. and G.A. Ackerman (1981), Adsorption of horse radish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscope level; A new method, theory and application. *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 1187-1200.
9. Chien, S. (1981), Colloidal gold-low density lipoprotein conjugates as membrane receptor probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 368-371.
10. May, K., M.E. Prior and I. Richards (1988), World patent application WO 88/08534. European Patent office.
11. Chen, T.S., F.Y. Chang and S.D. Lee (1997), Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection: comparison and correlation between enzyme-linked immunosorbent assay and rapid serological test results. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 184-6.
12. Cole, R.A., H.M. Lu, Y.Z. Shi, J. Wang, De-Hua T. and A.T. Zhou. (1996), Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic assay based on the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* on patients with pulmonary tuberculosis in China. *Tuber. Lung Dis.*, **77**, 363-368.
13. Klingenberg, D.V.K. and Espandiari, J. (1996), Evaluation of an one-step test for rapid, in practice detection of rotavirus in farm animals. *Vet. Rec.* **138**, 393-395.
14. Laitinen, M.P. and Vuento, M. (1996), Immunochromatographic assay for quantitation of milk progesterone. *Acta. Chem. Scand.*, **50**, 141-145.
15. Vaughn, D.W., A. Nisalak, S. Kalayanaroj, T. Solomon, N.M. Dung, A. Cuzzubbo, and P.L. Devine (1998), Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of Dengue virus infection. *J. Clin. Microb.*, **36**, 234-238.
16. Kumiko, S., I. Satoshi, I. Yoshitsugu, N. Toshi, S. Kaoru, and N. Nobuo (1996), Evaluation of immunochromatographic assay systems for rapid detection of hepatitis B surface antigen and antibody, Dainascreen HBsAg and Dainascreen Ausab. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1420-1422.
17. Frens, G. (1973), Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse suspensions. *Nature Physical Science*, **241**, 20-21.
18. Mimura, Y., K. Nakamura, T. Tanaka, and M. Fujimoto (1998), Evidence of intra- and extracellular modifications of monoclonal IgG polypeptide chains generating charge heterogeneity. *Electrophoresis*, **19**, 767-775.
19. Horisberger, M. and J. Rosset (1977), Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J. Histochem. cytochem.*, **25**, 295-301.
20. Geoghegan, W.D. (1988), The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold. *J. Histochem. Cytochem.* **36**, 401-407
21. Norde, W. (1986), Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **25**, 267-271